

517.311

(2)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

Rec'd PCT/PTO

17 DEC 2004

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2003年12月31日 (31.12.2003)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 2004/001066 A1

(51) 国際特許分類<sup>7</sup>:  
G01N 33/50, 33/15, C12C 1/16

C12Q 1/527,

究所内 Shizuoka (JP). 古庄 重樹 (FURUSHO,Shigeki) [JP/JP]; 〒425-0013 静岡県 烧津市 岡当目 10 サッポロビール株式会社 酿造技術研究所内 Shizuoka (JP). 小島 英敏 (KOJIMA,Hidetoshi) [JP/JP]; 〒425-0013 静岡県 烧津市 岡当目 10 サッポロビール株式会社 酿造技術研究所内 Shizuoka (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP2003/007887

(22) 国際出願日: 2003年6月20日 (20.06.2003)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(74) 代理人: 長谷川 芳樹, 外 (HASEGAWA,Yoshiki et al.); 〒104-0061 東京都 中央区 銀座一丁目 10番6号 銀座ファーストビル 創英國際特許法律事務所 Tokyo (JP).

(26) 国際公開の言語: 日本語

(81) 指定国(国内): CA, US.

(30) 優先権データ:  
特願2002-180315 2002年6月20日 (20.06.2002) JP

(71) 出願人(米国を除く全ての指定国について): サッポロビール株式会社 (SAPPORO BREWERIES LIMITED) [JP/JP]; 〒150-8686 東京都 渋谷区 恵比寿四丁目20番1号 Tokyo (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人(米国についてのみ): 黒田 久夫 (KURODA,Hisao) [JP/JP]; 〒425-0013 静岡県 烧津市 岡当目 10 サッポロビール株式会社 酿造技術研

(84) 指定国(広域): ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR).

添付公開書類:

— 國際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイドスノート」を参照。

A1

(54) Title: METHOD OF SCREENING MALT AND PROCESS FOR PRODUCING FOAMING MALT BEVERAGE

(54) 発明の名称: 麦芽のスクリーニング方法及び麦芽発泡飲料の製造方法

(57) Abstract: A method of screening malts, characterized by determining the fatty acid hydroperoxide-lyase activity of the malts; and a process for producing a foaming malt beverage, characterized by using a malt which has low fatty acid hydroperoxide-lyase activity and has been selected by the screening method.

(57) 要約: 麦芽中の脂肪酸ヒドロペルオキシドリーゼ活性を測定することを特徴とする麦芽のスクリーニング方法、並びにその方法によりスクリーニングされた前記脂肪酸ヒドロペルオキシドリーゼ活性の低い麦芽を用いることを特徴とする、麦芽発泡飲料の製造方法。

WO 2004/001066

## 明細書

### 麦芽のスクリーニング方法及び麦芽発泡飲料の製造方法

#### 技術分野

本発明は、麦芽のスクリーニング方法、並びにそれによりスクリーニングされた麦芽を用いた麦芽発泡飲料の製造方法に関する。

#### 背景技術

ビール、発泡酒などの麦芽発泡飲料の原料として利用される麦芽には、多量の脂質や脂肪酸が含まれる。これら脂質や脂肪酸は、麦芽発泡飲料の製造工程における仕込工程において、酵素リポキシゲナーゼまたは自動酸化により酸化され、  
脂質ヒドロペルオキシドや脂肪酸ヒドロペルオキシドを生ずることが知られている  
(Kobayashi, N., Kaneda, H., Kano, Y., and Koshino, S., J. Ferment. Bioeng., 76, 371-375, 1993)。このような脂質ヒドロペルオキシドは、麦芽に含まれるリパーゼにより加水分解を受け、脂肪酸ヒドロペルオキシドを生成することが知られている。この脂肪酸ヒドロペルオキシドは、熱分解や化学的分解により、老化臭、青臭み、脂肪酸臭などを有するアルデヒド類などの分解生成物を生成し、製品(麦芽発泡飲料)の香味を著しく損なう要因となることが知られている(Drost, B. W., van Eerde, P., Hoekstra, S. F., and Strating, J., Proc. of the 13th Congress, Estoril, Portugal, 1971)。

従来は、このような分解生成物の生成を抑える技術として、麦芽発泡飲料の製造工程において仕込温度を上げてリポキシゲナーゼ活性を抑制する方法、リポキシゲナーゼ活性の低い麦芽を用いる方法などが提案されてきた(Drost, B. W., van den Berg, R., Freijee, F. J.M., van der Velde, E. G., and Hollemans, M., J. Am. Soc. Brew. Chem., 48, 124-131, 1990)。

しかしながら、このような仕込温度を上げる方法では、蛋白質分解酵素や糖化酵素の作用も抑制され、発酵に必要な栄養源が不足し香味品質が損なわれるという問題があり、このような方法による老化臭の制御には限界があった。また、リ

ポキシゲナーゼ活性の低い麦芽を用いる方法として、麦芽を高温で処理しリポキシゲナーゼを失活させる方法もあるが、香味バランスが崩れたり、香味品質に悪影響を与えるという問題があり、充分な方法ではなかった。さらに、麦芽には既に脂質ヒドロペルオキシドが存在することが分かっている。この脂質ヒドロペルオキシドは、もろみ中のリバーゼにより脂肪酸ヒドロペルオキシドに加水分解され、リポキシゲナーゼが関与することなく、分解生成物が生成することから、リポキシゲナーゼ単独の抑制による香味品質の改善には限界があった(Kobayashi, N., Kaneda, H., Kano, Y., and Koshino, S., J. Am. Soc. Brew. Chem., 52(4): 141-5, 1994)。

## 10 発明の開示

本発明は、上記従来技術の有する課題に鑑みてなされたものであり、老化臭が低減された麦芽発泡飲料を製造するために有用な麦芽のスクリーニング方法（原料選抜方法）を提供し、さらに係る方法によりスクリーニングされた麦芽を用いた麦芽発泡飲料の製造方法を提供することを目的とする。

15 本発明者らは、上記目的を達成すべく銳意研究を重ねた結果、脂肪酸ヒドロペルオキシドが分解生成物（アルデヒド類など）に分解される過程においても酵素が関与することを初めて見出した。すなわち、本発明者らは、麦芽発泡飲料の製造工程において、もろみを製造する時に脂肪酸ヒドロペルオキシドリーゼが脂肪酸ヒドロペルオキシドを分解・開裂し、分解生成物を生成することを見出した。  
20 また、脂肪酸ヒドロペルオキシドリーゼは高い熱安定性を示し、従来の仕込温度を上げる方法ではこの酵素の働きを抑制することは困難であることを確認した。その結果、脂肪酸ヒドロペルオキシドリーゼ活性の低い麦芽をスクリーニングし、原料として利用することにより、分解生成物（老化物質）の生成が抑制され、より香味品質の良い麦芽発泡飲料を製造することが可能となることを見出し  
25 、本発明を完成するに至った。

すなわち、本発明の麦芽のスクリーニング方法は、麦芽中の脂肪酸ヒドロペル

オキシドリアーゼ活性を測定することを特徴とする方法である。

前記本発明のスクリーニング方法においては、(i)脂肪酸ヒドロペルオキシドが前記脂肪酸ヒドロペルオキシドリアーゼにより分解されて生成した分解生成物の生成量を測定することにより、前記脂肪酸ヒドロペルオキシドリアーゼ活性を評価してもよく、また、(ii)脂肪酸ヒドロペルオキシドが前記脂肪酸ヒドロペルオキシドリアーゼにより分解されることによる前記脂肪酸ヒドロペルオキシドの減少量を測定することにより、前記脂肪酸ヒドロペルオキシドリアーゼ活性を評価してもよい。

また、本発明の麦芽発泡飲料の製造方法は、前記本発明のスクリーニング方法によりスクリーニングされた前記脂肪酸ヒドロペルオキシドリアーゼ活性の低い麦芽を用いることを特徴とする方法である。

#### 図面の簡単な説明

図1は、証明試験1においてSPME-GC-MS解析するにあたって、実験区1～4にそれぞれ施した処理の概略を示す流れ図である。

図2は、証明試験1において得られた、実験区1～4における分解生成物(トランヌー2-ノネナール)の生成量を示すグラフである。

図3は、証明試験2において脂肪酸ヒドロペルオキシドリアーゼ活性を経時的に測定して得られた、脂肪酸ヒドロペルオキシドリアーゼ活性とマイシエ温度との経時的变化を示すグラフである。

図4は、証明試験3において得られた、実験区1～4における分解生成物(トランヌー2-ノネナール)の生成量を示すグラフである。

図5は、実施例4において得られた、ノネナールポテンシャルと9-リノール酸ヒドロペルオキシドリアーゼ活性との相関関係を示すグラフである。

#### 発明を実施するための最良の形態

以下、本発明の好適な実施形態について詳細に説明する。

(麦芽のスクリーニング方法)

本発明の麦芽のスクリーニング方法は、麦芽中の脂肪酸ヒドロペルオキシドリアーゼ活性を評価する方法である。本発明に係る脂肪酸ヒドロペルオキシドリアーゼとは、脂肪酸ヒドロペルオキシドを分解せしめる酵素である。ここで、脂肪酸ヒドロペルオキシドとは、麦芽中の脂質または脂肪酸から生成するものであり、例えば、リノール酸ヒドロペルオキシド（9-リノール酸ヒドロペルオキシド（9-H POD）、13-リノール酸ヒドロペルオキシド（13-H POD）、9-リノレン酸ヒドロペルオキシド、13-リノレン酸ヒドロペルオキシドが挙げられる。また、このような脂肪酸ヒドロペルオキシドは、Larodan Fine Chemicals, Malmo, Sweden などから入手することも可能である。

麦芽発泡飲料の製造工程において、このような脂肪酸ヒドロペルオキシドリアーゼが脂肪酸ヒドロペルオキシドの分解に関与することは、本発明の過程で本発明者らが初めて見出したものである。

本発明に係る脂肪酸ヒドロペルオキシドリアーゼ活性は、以下の(i)または(ii)の方法により好適に評価することができる。(i)麦芽抽出液に脂肪酸ヒドロペルオキシドを加える等して麦芽抽出液中の脂肪酸ヒドロペルオキシドの量を所定値とした後に、所定条件下（例えば、25℃で15分間）インキュベートし、脂肪酸ヒドロペルオキシドが脂肪酸ヒドロペルオキシドリアーゼにより分解されて生成した分解生成物の生成量を測定し評価する方法。(ii)麦芽抽出液に脂肪酸ヒドロペルオキシドを加える等して麦芽抽出液中の脂肪酸ヒドロペルオキシドの量を所定値とした後に、所定条件下インキュベートし、脂肪酸ヒドロペルオキシドが脂肪酸ヒドロペルオキシドリアーゼにより分解されることによる脂肪酸ヒドロペルオキシドの減少量を測定し評価する方法。このような麦芽抽出液は、所定量の粉碎麦芽を所定量の緩衝液（例えば、酢酸緩衝液）に加え、所定時間攪拌することにより得ることができる。また、このような分解生成物としては、脂肪酸ヒドロペルオキシドが分解されて生成したアルデヒド類が挙げられ、具体的には、ノネナール（トランス-2-ノネナール）、ヘキサナール、ヘキセナール

、ノネンジエナールなどが挙げられる。

このような分解生成物の生成量を測定する方法としては、特に制限されず、公知の方法により測定されるが、例えば、各種誘導体化試薬で分解生成物を誘導体化し高速液体クロマトグラフィー（HPLC）で測定する方法、分解生成物をガスクロマトグラフィーで測定する方法が使用できる。また、このような脂肪酸ヒドロペルオキシドの減少量を測定する方法としては、特に制限されず、公知の方法により測定されるが、例えば、基質である脂肪酸ヒドロペルオキシドの減少量を紫外吸光で測定する方法が使用できる。

脂肪酸ヒドロペルオキシドリニアーゼ活性は、このような分解生成物の生成量が少ない又は生成速度が遅いほど、或いは脂肪酸ヒドロペルオキシドの減少量が少ない又は減少速度が遅いほど、活性が低いと評価できる。また、脂肪酸ヒドロペルオキシドリニアーゼ活性は、上記方法により測定された測定値から、以下の式により算出することにより評価することもできる。

(i) 分解生成物（アルデヒド類）の生成量を測定する方法では、以下の計算式によって脂肪酸ヒドロペルオキシドリニアーゼ活性（酵素活性）を算出する。

酵素活性（mU/g） = 1分間における分解生成物の生成量（ $\mu M$ ） × 反応液全量（mL） ÷ 酵素液量（mL） ÷ 酵素液濃度（g/mL）

(ii) 脂肪酸ヒドロペルオキシドの減少量を紫外吸光で測定する方法では、以下の計算式によって酵素活性を算出する。

酵素活性（nkat/g） = 1分間における 234 nm の紫外吸光度減少 × 0.667 × 反応液全量（mL） ÷ 酵素液量（mL） ÷ 酵素液濃度（g/mL）。

このような活性の測定から、脂肪酸ヒドロペルオキシドリニアーゼ活性の低い麦芽を評価することが可能となり、脂肪酸ヒドロペルオキシドリニアーゼ活性のより低く、具体的には、酵素活性が 2 mU/g 以下、より好ましくは 0.1 mU/g 以下、または 5 nkat/g 以下、より好ましくは 1 nkat/g 以下である麦芽を好適にスクリーニングすることが可能となる。なお、上記方法による検出限

界は、分解生成物（アルデヒド類）の生成量を測定する方法では $0.1\text{ mU/g}$ であり、脂肪酸ヒドロペルオキシドの減少量を紫外吸光で測定する方法では $1\text{ nkat/g}$ である。

また、本発明に係る脂肪酸ヒドロペルオキシドリアーゼ活性を測定することにより、麦汁ノネナールポテンシャルとの相関により、製品老化を予測することが可能となる。ここで、製品老化とは、製品の容器充填後の保存に伴う、品質の劣化をいう。麦汁ノネナールポтенシャルとは、製品老化を予測できる指標であり、コングレス法 (European Brewery Convention. Analytica-EBC (5<sup>th</sup> ed.), 1998) により麦汁を作製し、Drostらの方法 (Drost, B. W., van den Berg, R., Freijee, F. J. M., van der Velde, E. G., and Holleman, M., J. Am. Soc. Brew. Chem., 48, 124-131, 1990) で測定することにより得られる指標である。麦汁ノネナールポтенシャルが $10\text{ ppb}$ 以下、より好ましくは $1\text{ ppb}$ 以下の麦芽は、老化耐久性の優れた麦芽発泡飲料を製造するための原料として好ましい。

#### (麦芽発泡飲料の製造方法)

本発明の麦芽発泡飲料の製造方法においては、本発明のスクリーニング方法によりスクリーニングされた脂肪酸ヒドロペルオキシドリアーゼ活性の低い麦芽が原料として用いられる。

このような本発明の製造方法は、通常の製造工程、すなわち、糖化工程、麦汁煮沸工程、冷却工程、発酵工程、熟成工程を含んでいればよく、その具体的な工程は特に制限されず、一般的な条件が採用される。

糖化工程は、麦芽を含む原料を糖化させることにより糖化液を得る工程である。本発明で用いられる麦芽は、本発明のスクリーニング方法によりスクリーニングされた脂肪酸ヒドロペルオキシドリアーゼ活性の低い麦芽であり、具体的には、酵素活性が $2\text{ mU/g}$ 以下、より好ましくは $0.1\text{ mU/g}$ 以下、または $5\text{ nkat/g}$ 以下、より好ましくは $1\text{ nkat/g}$ 以下である麦芽が好ましい。また、このような麦芽は大麦に水分と空気とを十分に与えて発芽させ、乾燥して幼

5

芽を取り除いたものであることが好ましい。麦芽は麦汁製造に必要な酵素源であると同時に糖化の原料として主要な澱粉源となる。また、麦芽を焙燥することにより、麦芽発泡飲料特有の香味と色素とを付与することができる。例えば、大麦を浸麦度40～45%まで浸麦した後、10～20℃で3～6日間発芽させ、これを焙煎することによって目的の麦芽を得ることができる。

10

麦芽を含む原料を糖化する方法は、特に制限されないが、例えば、麦芽を含む原料と仕込み用水とを仕込み釜に入れて混合し、その混合物を所定の温度（好ましくは65～75℃）に加温した後、必要に応じて濾過により滓を除去して糖化液を得ることができる。原料中の麦芽の使用比率は、ビール、発泡酒等の麦芽発泡飲料の種類に応じて適宜選定される。また、このとき、市販又は別途調製されたモルトエキスを仕込み用水と混合してもよく、必要に応じてコーンスターク、コーングリッツ、米、糖類などの副原料を添加してもよい。

15

麦汁煮沸工程は、糖化液を濾過して得られる麦汁にホップを添加し、その混合物を煮沸する工程である。これにより、麦芽発泡飲料特有の香りと苦味とが付与され、また、麦芽の酵素の働きが止められる。糖化液におけるホップの含有量は好ましくは0.5～3.0g/Lの範囲内であり、また、当該混合物の煮沸時間は好ましくは90～120分間である。

20

麦汁煮沸工程後の麦汁（熱麦汁）は、所定の温度まで冷却された後、後述する発酵工程に供される。この冷却工程においては、熱麦汁を通常15℃以下まで冷却する。

25

発酵工程では、冷却工程後の麦汁に酵母を添加して、麦汁を発酵させることにより発酵液が得られる。発酵工程で用いられる酵母は、麦汁内の糖分を代謝してアルコールや炭酸ガス等を産生するもの（いわゆるアルコール発酵を行う酒類酵母）であれば特に制限されず、具体的には、サッカロミセス・セレビシエ、サッカロミセス・ウバルム等が挙げられる。

また、発酵条件については特に制限されないが、発酵温度は好ましくは15℃

以下、より好ましくは8～10℃であり、発酵時間は好ましくは8～10日である。このようにして得られる発酵液を熟成した後、これを濾過することによって、麦芽発泡飲料が得られる。

熟成工程における条件は特に制限されないが、例えば密閉タンク等に貯蔵して  
5 貯蔵温度-5～3℃で30～90日間貯蔵することにより残存エキスの再発酵と熟成とを好適に行うことができる。

また、濾過条件についても特に制限されないが、濾過助剤として珪藻土、PV  
PP(ポリビニルポリピロリドン)、シリカゲル、セルロースパウダー等を用いて  
濾過を行う。濾過された麦芽発泡飲料はタンク詰め、たる詰め、瓶詰め、缶詰め  
10 等されて市場に出荷される。

本発明の方法で製造可能な麦芽発泡飲料としては、例えば、ビール、発泡酒が挙げられる。また、本発明の製造方法により製造された麦芽発泡飲料は、麦芽由來の脂肪酸ヒドロペルオキシドが分解されることにより生成するアルデヒド類等の老化物質の含有量が少なく、老化耐久性に優れている。

### 15 [実施例]

以下、実施例により本発明の内容をより具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例に何ら限定されるものではない。まず、脂肪酸ヒドロペルオキシドリアーゼが脂肪酸ヒドロペルオキシドを分解生成物に分解する酵素であることを証明するために、以下の試験を行った。

### 20 (証明試験1)

脂肪酸ヒドロペルオキシドリアーゼが脂肪酸ヒドロペルオキシドを分解する酵素であり、もろみで働くことの証明

図1に示すように、4つの実験区1～4を設定し、以下の3段階の処理を行った。(1) 麦芽中のリポキシゲナーゼ(LOX)失活処理として、それぞれ70℃  
25 に保温された仕込水10mlに粉碎麦芽3.5gを加え、攪拌しながら70℃30分間インキュベートした。粉碎麦芽3.5gにはLOXが1.6ユニット含有

されるが、この処理で麦芽中のLOXは失活する。(2)麦芽中の脂肪酸ヒドロペルオキシドリアーゼに対する処理として、実験区1と2は氷浴に静置し脂肪酸ヒドロペルオキシドリアーゼ活性を残存せしめ、実験区3と4は10分間煮沸することにより脂肪酸ヒドロペルオキシドリアーゼを失活させた。(3)脂肪酸ヒドロペルオキシドリアーゼ活性を測定する前処理として、実験区1と3には組換えオムギリポキシゲナーゼ(以下「組み換えLOX-1」という)を、実験区2と4には熱失活した組換えオムギリポキシゲナーゼ(以下「熱変性組み換えLOX-1」という)を添加した(それぞれ1.6ユニット)。組み換えLOX-1及び熱変性組み換えLOX-1は、それぞれ黒田の方法等により準備した(Kuroda, H., Kobayashi, N., Kaneda, H., Watari, J., Takashio, M., J. Biosci. Bioengi., 93:, 2002)。その後、すべての実験区を50°C 20分間インキュベートし、遠心分離によって上清を回収した(15,000×g、10分間)。

以上3段階の処理の後、SPME-GC-MS(Hewlett Packerd HP6890/MSD system)により、分解生成物濃度を測定した結果、次の事が分かった。なお、本試験では、分解生成物としてトランス-2-ノネナールを測定し、測定結果はnMを単位として示した。また、トランス-2-ノネナールは、9-リノール酸ヒドロペルオキシドが分解することにより生成することから、本試験においては脂肪酸ヒドロペルオキシドリアーゼの中の、9-リノール酸ヒドロペルオキシドリアーゼの活性を測定している。

図2に示すように、脂肪酸ヒドロペルオキシドリアーゼが活性で、組み換えLOX-1を添加した実験区1では、トランス-2-ノネナール濃度は著しく大きく増加した。一方、脂肪酸ヒドロペルオキシドリアーゼが活性で、熱変性組み換えLOX-1を添加した実験区2では、トランス-2-ノネナール濃度はほとんど増加しなかった。脂肪酸ヒドロペルオキシドリアーゼが失活した実験区3と4では、組換え又は熱変性組み換えLOX-1の添加によるトランス-2-ノネナール濃度增加は僅かであった。この結果は、70°C 30分間のインキュベートでは

失活せず、煮沸すると失活するトランスー2-ノネナールの生成を促進する因子が存在することを示している。この因子は、LOXが麦芽由来のリノール酸を酸化することによって生成する9-リノール酸ヒドロペルオキシドを開裂する酵素、すなわち9-リノール酸ヒドロペルオキシドリアーゼ（脂肪酸ヒドロペルオキシドリアーゼ）である。

さらに、前記脂肪酸ヒドロペルオキシドリアーゼが麦芽発泡飲料の製造工程において耐熱性を有し、酵素として働いていることを証明するために、以下の試験を行った。

(証明試験 2)

脂肪酸ヒドロペルオキシドリアーゼが脂肪酸ヒドロペルオキシドを分解する酵素であり、耐熱性を有することの証明

仕込工程における脂肪酸ヒドロペルオキシドリアーゼの働きを解析するために、実験室レベルのコングレス糖化試験を実施し、経時的にマイシェを分離した。マイシェサンプルを遠心分離し（3,000×g、15分間）、上清または沈殿に分け、沈殿はさらに0.15%のTriton Xを含む酢酸緩衝液（0.1M、pH 6.0）を用いて抽出した。なお、本試験では、脂肪酸ヒドロペルオキシドとしてリノール酸ヒドロペルオキシド（9-HPODまたは13-HPOD）を測定した。

キュベットに500μlの酢酸緩衝液（0.1M、pH 6.0）と終濃度40μMの9-HPODまたは13-HPODを加え、次に5μlの酵素液（分離した上清または沈殿の抽出液）を添加、混合し9-HPOD及び13-HPODの共役ジエン構造の吸収波長234nmを追跡して、リノール酸ヒドロペルオキシドの減少速度を測定した。その測定結果から酵素活性（分解活性（nkat/g沈殿））を以下の計算式を用いて求め、図3に示した。なお、測定機器は日立分光光度計U-3500を用いた。

酵素活性 ( $n k a t / g$ ) = 1分間における 234 nm の紫外吸光度減少  $\times 0.6$   
6.7  $\times$  反応液全量 (mL)  $\div$  酵素液量 (mL)  $\div$  酵素液濃度 (g/mL)。

マイシェ上清からは分解活性が全く検出されなかつたが、沈殿を界面活性剤で可溶化した抽出液からは分解活性が検出された。仕込初期の分解活性は、13-H POD (△) 分解活性が 9-H POD (○) 分解活性に比べ、約 2 倍の分解活性を示した。また、9-リノール酸ヒドロペルオキシドリアーゼ及び 13-リノール酸ヒドロペルオキシドリアーゼは、70°C で 30 分経過しても分解活性を示すことから、リポキシゲナーゼよりも高い耐熱性を有しているといえる。また、9-リノール酸ヒドロペルオキシドリアーゼ及び 13-リノール酸ヒドロペルオキシドリアーゼは、それぞれ耐熱性が異なり、9-リノール酸ヒドロペルオキシドリアーゼの方が高い耐熱性を示し、糖化終了後においても最大（仕込初期）の約 1 割ほどが残存することが分かった。また、9-H POD 分解活性と 13-H POD 分解活性が異なることからリノール酸ヒドロペルオキシドリアーゼには基質特異性の異なる 2 つのアイソザイムが存在することが明らかとなり、それぞれのアイソザイムがそれぞれノネナール（トランス-2-ノネナール）とヘキサンナールを生成する。

証明試験 1、2 より、脂肪酸ヒドロペルオキシド（9-リノール酸ヒドロペルオキシド）から分解生成物（トランス-2-ノネナール）が生成する因子は、脂肪酸ヒドロペルオキシドリアーゼ（9-リノール酸ヒドロペルオキシドリアーゼ）であることが証明された。次に、脂肪酸ヒドロペルオキシドリアーゼの製品（麦芽発泡飲料）への影響を調べるために、以下の試験を行った。

### （証明試験 3）

脂肪酸ヒドロペルオキシドリアーゼがもろみで働いた場合、発酵後の製品の老化物質が増加することの証明

4 つの実験区 1～4 を設定し、粉碎麦芽、仕込水、LOX の量を変えた以外は、処理（1）～（3）に関しては証明試験 1 と同様に行った。（1）それぞれ 70°C

に保温された仕込水 50m l に粉碎麦芽 17.5 g を加え、攪拌しながら 70°C 30 分間インキュベートした。次に実験区 1 と 2 は氷浴に静置し、実験区 3 と 4 は 10 分間煮沸した。(2) 実験区 1 と 2 は氷浴に静置し脂肪酸ヒドロペルオキシドリアーゼ活性を残存せしめ、実験区 3 と 4 は 10 分間煮沸することにより脂肪酸ヒドロペルオキシドリアーゼを失活させた。(3) 次に実験区 1 と 3 に組み換え L O X - 1 を、実験区 2 と 4 には熱変性組み換え L O X - 1 を添加した(7.9 ユニット)。組み換え L O X - 1 及び熱変性組み換え L O X - 1 は、証明試験 1 と同様に準備した。その後、すべての実験区(サンプル)を 50°C 20 分間インキュベートし、ろ紙を用いてろ過した。

さらに残渣を 50°C に保温した 50m l の蒸留水で洗った。これにホップエキス 0.2 g を添加し、100°C で 90 分間煮沸後、下面酵母 1.2 g を添加し 12°C で 11 日間発酵させた。発酵液上澄みを 12°C 1 週間、さらに 4°C 2 週間熟成し、これをメンブランフィルター濾過し、証明試験 1 と同様にトランス-2-ノネナールを測定した(図 4)。その結果、証明試験 1 で見られたトランス-2-ノネナール濃度の差異がビールにおいても観察され、脂肪酸ヒドロペルオキシドリアーゼ(9-リノール酸ヒドロペルオキシドリアーゼ)が仕込工程等において働き、その結果生成した分解生成物(トランス-2-ノネナール)が製品に残存することが証明された。

また、脂肪酸ヒドロペルオキシドリアーゼを失活させた実験区 3 では、トランス-2-ノネナールの製品における残存量が少ないとから、脂肪酸ヒドロペルオキシドリアーゼ活性の低い麦芽を麦芽発泡飲料の製造に用いることが、老化臭の低減された製品を製造するために有用であることが確認された。以下、脂肪酸ヒドロペルオキシドリアーゼ活性の測定方法について、実施例をもとに説明する。

25 (実施例 1)

HPLCによる脂肪酸ヒドロペルオキシドリアーゼ活性の測定

麦芽 1 g をコーヒーミルで粉碎し、10 mL の 0. 15% Tween 20 を含む酢酸緩衝液 (0. 1M, pH 5. 5) を加えて一時間攪拌した。次に、4°C、15, 000 g の条件で遠心し、上清を分離した。上清 1 mL に対し、終濃度 1 00 μM の 9-H POD または 13-H POD を加え、25°C の条件で 15 分間インキュベートした後、1 mL の 0. 1% 2, 4-ジニトロフェニルヒドラジンと 0. 5 M 酢酸を含むエタノール溶液を加え混合し、反応停止と誘導体化を行った。この溶液を 3 時間室温で放置した後、ヘキサンで抽出した。生成した分解生成物であるノネナールは、高速液体クロマトグラフィー (C-R7A/LV-10A HPLC system) で Zorbax ODS カラムを用いて分離・定量した。溶離液はアセトニトリル：水：酢酸 (600 : 400 : 1) を用いた。分解生成物（ノネナール）の生成量の測定後、以下の計算式によって酵素活性を算出した。

$$\text{酵素活性 (mU/g)} = \frac{\text{1分間における分解生成物の生成量 (\mu M)}}{\text{酵素液量 (mL)}} \times \frac{\text{反応液全量 (mL)}}{\text{酵素液濃度 (g/mL)}}$$

上記の方法により麦芽 20 点に対して、9-リノール酸ヒドロペルオキシドリアーゼ活性の測定を行った。その結果、各麦芽の 9-リノール酸ヒドロペルオキシドリアーゼ活性は、概ね 2 ~ 6 mU/g の範囲にあることがわかった。

#### (実施例 2)

##### ガスクロマトグラフィーによる脂肪酸ヒドロペルオキシドリアーゼ活性の測定

実施例 1 と同様に麦芽抽出液を用意した。抽出液 1 mL をガスクロマトグラフィー用バイアルに分注し、氷冷した。終濃度 100 μM の 9-H POD または 13-H POD を加え、25°C の条件で 10 分間インキュベートした後、スペルコ製ポリジメチルシリコサン SPME ファイバーを挿入し、さらに 5 分間インキュベートし、ガスクロマトグラフィー (Hewlett Packerd HP6890/MSD system) に供試した。キャピラリーカラムは J & W 社製 DB-1 (30 m × 0.25 mm, フィルム厚 1 μm) を用い、キャリアガスとしてヘリウム (1 mL/分) を用い、オープン条件は 60°C から 225°C (5°C/分)、セレクトイオンモード (m/z :

70, 72) の条件でヘキサナールまたはノネナールを定量した。分解生成物(アルデヒド類)の生成量の測定後、以下の計算式によって酵素活性を算出した。

$$\text{酵素活性 (mU/g)} = \frac{\text{1分間における分解生成物の生成量 (\mu M)}}{\text{反応液全量 (mL)}} \times \frac{\text{酵素液濃度 (g/mL)}}{\text{酵素液量 (mL)}}$$

5 上記の方法により麦芽20点に対して9-リノール酸ヒドロペルオキシドリアーゼ活性の測定を行った。その結果、各麦芽の9-リノール酸ヒドロペルオキシドリアーゼ活性は、概ね2~6 mU/gの範囲にあることがわかった。

### (実施例3)

#### 基質減少量測定による脂肪酸ヒドロペルオキシドリアーゼ活性の測定

10 実施例1と同様に麦芽抽出液を用意した。キュベットに500 μlの酢酸緩衝液(0.1M, pH 6.0)と終濃度40 μMの9-HPODまたは13-HPODを加え、次に5 μlの酵素液を添加、混合しリノール酸ヒドロペルオキシドの共役ジエン構造の吸収波長234 nmを追跡した。測定は、証明試験2と同様の方法で行った。リノール酸ヒドロペルオキシドの減少速度から酵素活性を以下の計算式を用いて算出した。

$$\text{酵素活性 (nkat/g)} = \frac{\text{1分間における234 nmの紫外吸光度減少} \times 0.667}{\text{反応液全量 (mL)}} \times \frac{\text{酵素液濃度 (g/mL)}}{\text{酵素液量 (mL)}}$$

15 上記の方法により麦芽20点に対して9-リノール酸ヒドロペルオキシドリアーゼ活性の測定を行った。その結果、各麦芽の9-リノール酸ヒドロペルオキシドリアーゼ活性は、概ね5~20 nkat/gの範囲にあることがわかった。

### (実施例4)

#### 脂肪酸ヒドロペルオキシドリアーゼと老化指標との相関

20 麦芽20点を用意し、コングレス法により麦汁を作製した。麦汁ノネナールポテンシャルをDrosstらの方法で測定し、麦芽の脂肪酸ヒドロペルオキシドリアーゼを実施例2の方法で測定した。両者をプロットすると、図5に示すように正の相関が見出された( $r = 0.53$ )。ノネナールポテンシャルは製品老化を予

測できる指標であり、ノネナールポテンシャルが 10 p p b 以下、より好ましくは 1 p p b 以下の麦芽は、脂肪酸ヒドロペルオキシドリアーゼ活性が低く好ましい。よって、脂肪酸ヒドロペルオキシドリアーゼを測定すれば、麦汁ノネナールポテンシャルとの相関関係により製品老化を予測する事が可能となる。

## 5 産業上の利用可能性

本発明のスクリーニング方法を利用することにより、老化臭が低減された麦芽発泡飲料を製造するために有用な、すなわち脂肪酸ヒドロペルオキシドの分解によるアルデヒド類等の老化物質の生成が抑制される麦芽をスクリーニングすることが可能となる。そして、本発明のスクリーニング方法でスクリーニングされた 10 脂肪酸ヒドロペルオキシドリアーゼ活性の低い麦芽を利用することにより、仕込み工程中等における老化物質である分解生成物の生成を抑制し、老化耐久性に優れた麦芽発泡飲料を製造することが可能となる。

## 請求の範囲

1. 麦芽中の脂肪酸ヒドロペルオキシドリアーゼ活性を評価することを特徴とする麦芽のスクリーニング方法。
- 5 2. 脂肪酸ヒドロペルオキシドが前記脂肪酸ヒドロペルオキシドリアーゼにより分解されて生成した分解生成物の生成量を測定することにより、前記脂肪酸ヒドロペルオキシドリアーゼ活性を評価することを特徴とする、請求項1に記載のスクリーニング方法。
- 10 3. 脂肪酸ヒドロペルオキシドが前記脂肪酸ヒドロペルオキシドリアーゼにより分解されることによる前記脂肪酸ヒドロペルオキシドの減少量を測定することにより、前記脂肪酸ヒドロペルオキシドリアーゼ活性を評価することを特徴とする、請求項1に記載のスクリーニング方法。
- 15 4. 請求項1～3のうちのいずれか一項に記載のスクリーニング方法によりスクリーニングされた前記脂肪酸ヒドロペルオキシドリアーゼ活性の低い麦芽を用いることを特徴とする、麦芽発泡飲料の製造方法。

図1

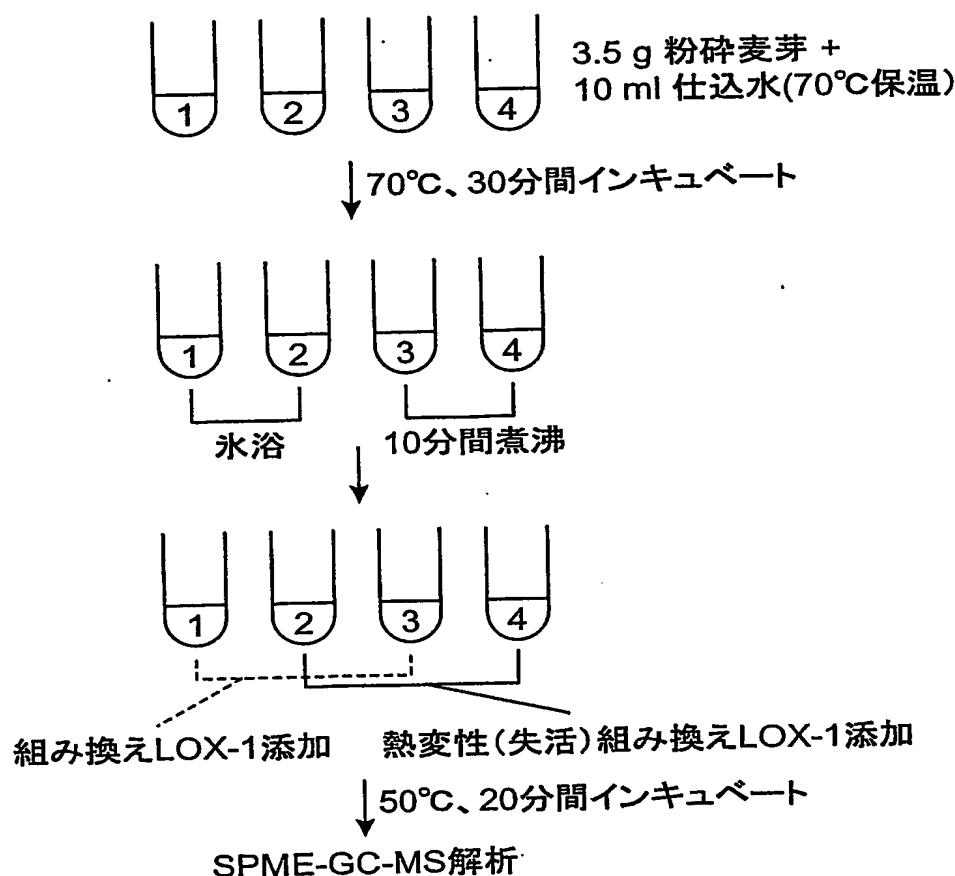


図2

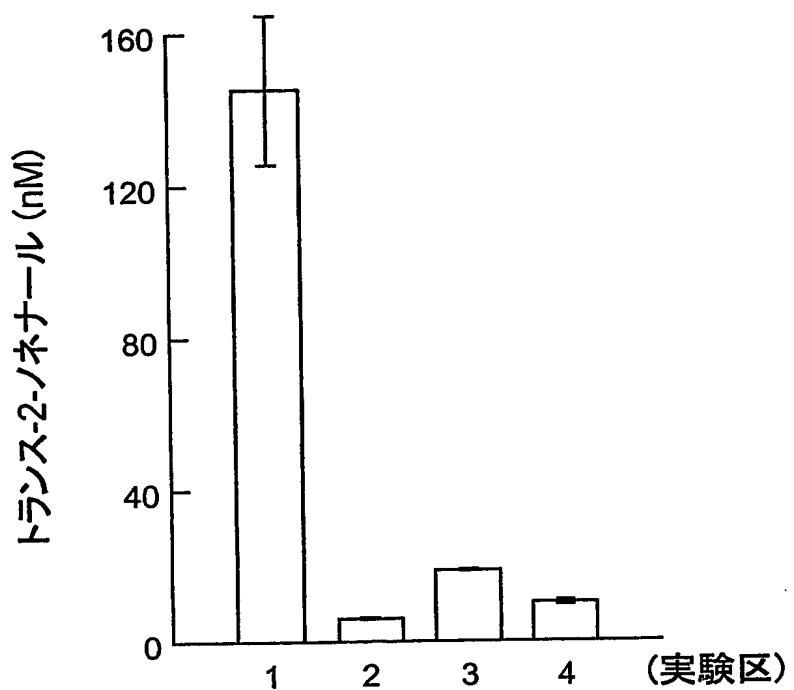


図3

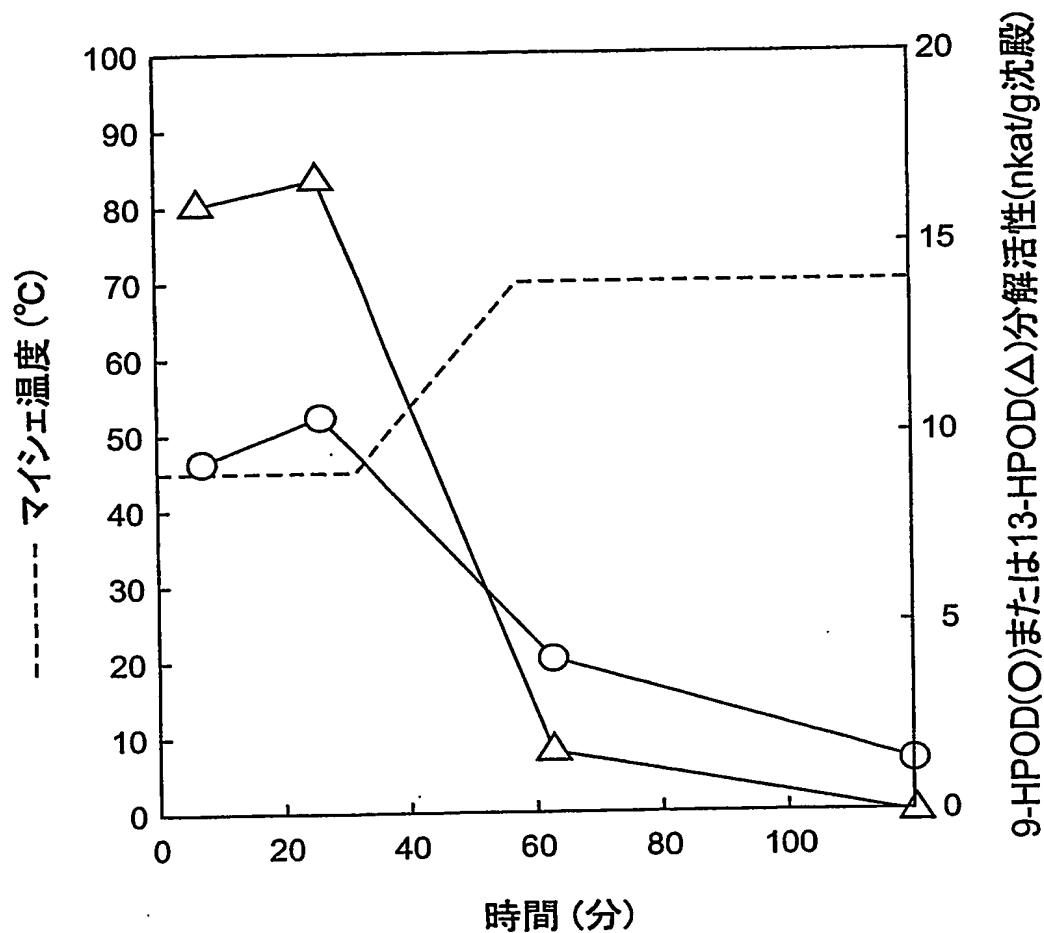


図4

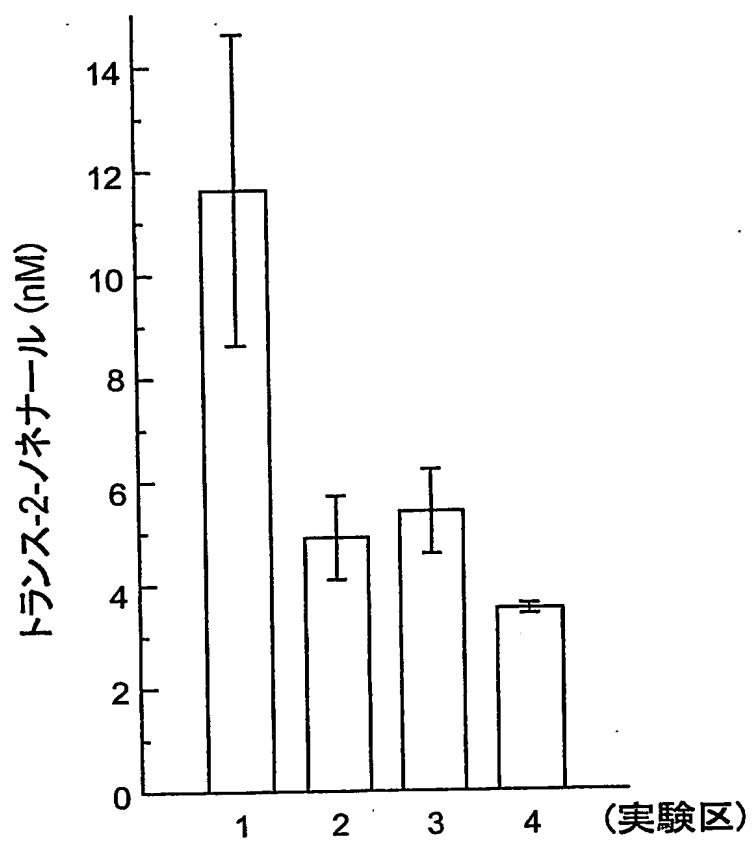
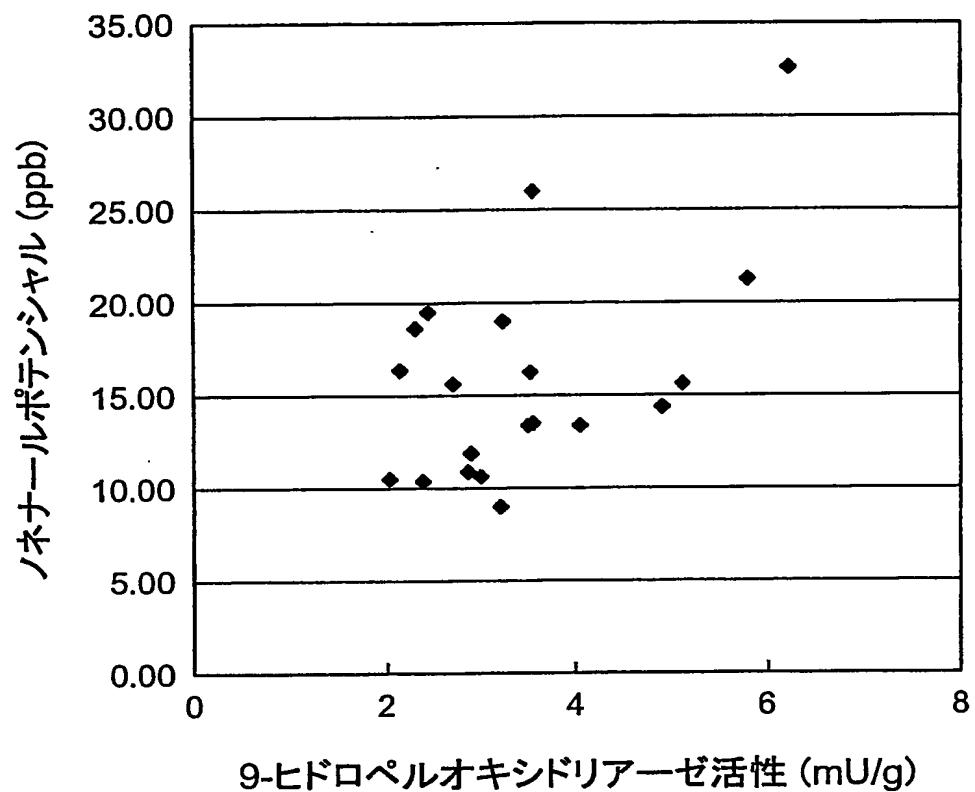


図5



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/07887

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> C12Q1/527, G01N33/50, G01N33/15, C12C1/16

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> C12Q1/00-70, C12N9/00-99, G01N33/00-98, C12C1/00-13/10

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

MEDLINE (STN), WPI (STN), BIOSIS (STN), JICST-EPLUS (STN)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, Y	H. KURODA et al., "Characterization of factors involved in the production of 2(E)-nonenal during mashing", Bioscience Biotechnology and Biochemistry, April, 2003, Vol.67, No.4, pages 691 to 697	1-4
A	JP 2001-029097 A (Sapporo Breweries Ltd.), 06 February, 2001 (06.02.01), (Family: none)	1-4

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

## \* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&amp;" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
07 August, 2003 (07.08.03)Date of mailing of the international search report  
19 August, 2003 (19.08.03)Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））

Int. C1' C12Q 1/527, G01N33/50, G01N33/15, C12C 1/16

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC））

Int. C1' C12Q 1/00~70, C12N 9/00~99, G01N33/00~98, C12C1/00~13/10

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

MEDLINE (STN), WPI (STN), BIOSIS (STN), JICST-EPLUS (STN)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
P Y	H. Kuroda et al., "Characterization of factors involved in the production of 2(E)-nonenal during mashing." Bioscience Biotechnology and Biochemistry, (April 2003), Vol. 67, No. 4, p. 691-697	1-4
A	JP 2001-029097 A (サッポロビール株式会社) 2001.02.06 (ファミリーなし)	1-4

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

## の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

07.08.03

国際調査報告の発送日 9.08.03

## 国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官（権限のある職員）

齊藤 真由美

4B 8931

電話番号 03-3581-1101 内線 3448